

PCT

ORGANISATION MONDIALE I
Bureau

WO 9602572A2

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :C07K 14/755, 10/36, 16/42, A61K 38/3,
G01N 33/68, A61K 39/395

A2

(43) Date de publication internationale: 1er février 1996 (01.02.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE95/00068

(22) Date de dépôt international: 14 juillet 1995 (14.07.95)

(30) Données relatives à la priorité:

9400666

14 juillet 1994 (14.07.94)

BE

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CROIX-ROUGE DE BELGIQUE [BE/BE]; Dépt. Central de Fractionnement, Rue Joseph-Stallaert 5, B-1060 Bruxelles (BE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LAUB, Ruth [BE/BE]; Avenue Besme 6, B-1190 Bruxelles (BE). DI GIAMBATISTA, Mario [BE/BE]; Rue Plouchart 24, B-7090 Braine-le-Comte (BE).

(74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1080 Bruxelles (BE).

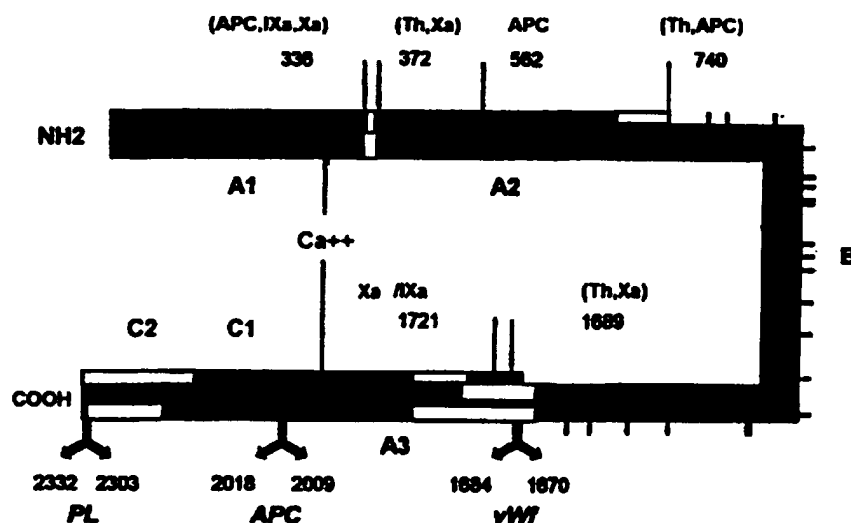
(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(54) Title: ANTIGENIC POLYPEPTIDE SEQUENCE OF FACTOR VIII, FRAGMENTS AND/OR EPTTOPES THEREOF

(54) Titre: SEQUENCE POLYPEPTIDIQUE ANTIGENIQUE DU FACTEUR VIII, FRAGMENTS ET/OU EPTTOPES DE CELLE-CI



(57) Abstract

The present invention relates to an antigenic polypeptide sequence of factor VIII, comprised between the Glutamic Acid 1649 and Asparagine 2019, preferably comprised between Arginine 1652 and Arginine 1917 of the polypeptide sequence of factor VIII, or comprised between Alanine 108 and Methionine 355, or comprised between Aspartic Acid 403 and Aspartic Acid 725, or comprised between Lysine 2085 and Lysine 2249.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une séquence polypeptidique antigénique du facteur VIII, comprise entre l'Acide Glutamique 1649 et l'Asparagine 2019, de préférence comprise entre l'Arginine 1652 et l'Arginine 1917 de la séquence polypeptidique du facteur VIII, ou comprise entre l'Alanine 108 et la Méthionine 355, ou comprise entre l'Acide Aspartique 403 et l'Acide Aspartique 725, ou comprise entre la Lysine 2085 et la Lysine 2249.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Sllovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

5

10 SEQUENCE POLYPEPTIDIQUE ANTIGENIQUE DU FACTEUR VIII.
 FRAGMENTS ET/OU EPITOPES DE CELLE-CI.

Objet de l'invention.

 La présente invention concerne la séquence
15 polypeptidique antigénique du facteur VIII, des fragments, des
épitopes de celle-ci et les parties fortes de ces épitopes,
les inhibiteurs dirigés contre cette séquence, ses fragments,
ses épitopes et/ou les parties fortes de ces épitopes, ainsi
que les anti-inhibiteurs dirigés contre lesdits inhibiteurs.

20 La présente invention concerne également une
composition pharmaceutique ainsi qu'un dispositif de diagnostic
comprenant les molécules sus-mentionnées.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention.

 Récemment, ont été mises en quantités suffisantes,
25 à la disposition des hémophiles, des préparations de facteur
VIII purifiées à partir de grands pools de plasma par
chromatographie échangeuse d'ions, ou très récemment par
immunoaffinité.

 Différentes préparations de FVIII obtenues par
30 ingénierie génétique sont actuellement en développement ou en
étude clinique. Ces FVIII sont soit des molécules entières,
soit délétées (Bihoreau (1992)).

 Le FVIII est un cofacteur glycoprotéinique de la
coagulation plasmatique et agit au niveau de l'activation du
35 facteur X (FX). La caractérisation du FVIII et de son mécanisme
d'action est rendue plus ardue par sa faible concentration dans

le plasma, l'hétérogénéité de taille, et son extrême sensibilité à la dégradation enzymatique. Cette réaction comprend la protéolyse du FX en facteur X activé (FXa = facteur Stuart) et fait intervenir un complexe (complexe Tenase) 5 comprenant l'enzyme (FIX activé ou FIXa), un cofacteur (le FVIII activé ou FVIIIa), des ions calcium et des phospholipides.

Le FVIII est une protéine si complexe que, bien que la séquence du gène soit connue depuis 1984 (Verhar et al., 10 Nature 312, pp. 317-342 (1984)), la structure complète du FVIII plasmatique n'est pas encore établie (près de 50% de la protéine a seulement été séquencée) ainsi que la structure précise des carbohydrates. La séquence de DNA a été admise 15 aux directives prescrites par la FDA pour les produits thérapeutiques issus de la biotechnologie).

Cependant, des différences subtiles entre le FVIII plasmatique et le FVIII recombinant ont été établies : glycosylation, demi-vie plasmatique après infusion,

20 Le FVIII est essentiellement synthétisé dans les hépatocytes. Il a été cloné dans des cellules de mammifères, d'insectes et de levures (Webb et al., 1993). Ces glycoprotéines produites par des processus biotechnologiques peuvent présenter des différences dans la structure et la 25 composition des sucres par rapport à la protéine naturelle. Le cDNA du FVIII a aussi été exprimé dans des ovins transgéniques (Halter et al., 1993).

Le cDNA code pour un polypeptide de 2351 acides aminés y compris le peptide signal de 19 acides aminés clivé 30 dans le réticulum endoplasmique. Des modifications post-traductionnelles ont lieu dans l'appareil de Golgi: glycosylation des sérines et des thréonines et addition d'ions sulfates aux résidus tyrosine. Après maturation, la protéine est ensuite sécrétée dans le plasma, sous forme de 2 chaînes 35 210 kDa (1à 1648 résidus) et 80 kDa (de 1649 à 2332 résidus) unies par un ion divalent, et dont la plus légère est associée

de manière non covalente au Facteur von Willebrand (vWf) par son extrémité N-terminale (1 molécule vWf par molécule de FVIII). Dans le plasma, ce complexe est stabilisé par des liens hydrophobes et hydrophiles en présence de 50 fois plus de vWf.

5 Ce dernier inhiberait la fixation du FVIII aux phospholipides. Le fait que FVIII se lie aux plaquettes a été établi, toutefois la présence de récepteurs spécifiques exprimés à la surface des plaquettes n'a pas été clairement démontrée (Nesheim et al., 1993). Après sa fixation sur les phospholipides membranaires,

10 il démasquerait des sites de liaison de haute affinité pour le FIXa (Bardelle et al., 1993).

Le FVIII est formé de trois domaines structuraux A, B et C (Kaufman RJ, 1992; Bihoreau et al., 1992) organisés en A1:A2:B:A3:C1:C2 (figure 1). Les domaines A ont plus de 40%

15 d'homologie et sont aussi homologues à la céruloplasmine. Il existe également 30% d'homologie entre le domaine A du facteur V et du FVIII. Le domaine C intervient deux fois et serait capable de lier des glycoconjugués et des phospholipides à charge nette négative (Kemball-Cook and Barrowcliffe (1992);

20 Fay, PJ, 1993)). Il présente une homologie avec des lectines capables de se lier aux phospholipides chargés négativement. C'est à ce niveau qu'a été localisé le site de fixation aux plaquettes (domaine C2) (Foster et al., (1990)). Le domaine B qui représente plus de 40% de la masse du FVIII, n'a aucune

25 activité spécifique connue mais pourrait jouer un rôle subtil dans la régulation de FVIII en le protégeant par exemple de l'action de la thrombine. Il n'a pas d'homologie connue avec d'autres protéines.

Il possède 19 sites de glycosylation sur les 25

30 identifiés pour le FVIII. La comparaison des séquences en acides aminés entre les FVIII humain et porcin, fait apparaître des différences majeures au niveau de cette région B. Néanmoins le FVIII porcin est utilisé efficacement pour traiter les hémophiles présentant des inhibiteurs. Ces observations ont

35 mené à la construction d'un gène FVIII délété dans la partie codante de cette région B et qui permet la production d'un

FVIII recombinant délété destiné au traitement de l'hémophilie.

Par immunopurification, différentes formes de FVIII actif ont été isolées qui ont en commun une chaîne légère de 80 kDa et dont la chaîne lourde peut avoir un poids moléculaire entre 210 et 90 kDa. Ces formes seraient issues de la dégradation progressive de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde. La liaison des deux chaînes est non covalente et résulte via une liaison d'un ion métallique divalent (Me^{++}) entre les résidus responsables des domaines A1 et A3. Après formation du complexe activé (50-45 kDa) (chaîne lourde avec domaine A2 accessible) et 70 kDa (chaîne légère), une phase d'inactivation est observée suite probablement à un contact prolongé à la thrombine et une dissociation des fragments 50 kDa et 45 kDa. Le FVIIIa est aussi inactivé par la protéine C activée (APC) après protéolyse de la chaîne lourde. Cette inactivation est accélérée si le FVIIIa est fixé sur une surface phospholipique. Cette "down-regulation" de l'activité du FVIIIa dépendrait d'une phosphorylation par un enzyme plaquettaire (Kalafatis et al, (1990)).

La plupart des épitopes reconnus par les divers monoclonaux murins isolés à ce jour ne semblent pas être localisés dans les "sites fonctionnels" du FVIII. Quelques épitopes reconnus par des anticorps ayant un effet sur l'activité du FVIII (inhibition du test chromogénique et/ou clotting) ont été identifiés.

Ces déterminants antigéniques sont constitués des fragments 351 - 365 (domaine A1 - chaîne lourde), 713 - 740 (domaine A2), 1670 - 1684 (domaine A3 - chaîne légère) (NH2 terminal de la chaîne légère) ou encore 2303 - 2332 (domaine C2 - chaîne légère) (Foster C, (1990)), les fragments 701 - 750 (Ware et al. (1989)), 1673 - 1689 (Leyte et al. (1989)), 330 - 472, 1694- 1782 (EP-0 202 853), 322 - 740 et 2170 - 2322 (Scandella et al. (1992)).

Les anticorps reconnaissent ces divers sites, interfèrent respectivement avec l'activation du FVIII, la liaison du vWf ou la liaison des phospholipides.

D'autres anticorps, non inhibiteurs des tests classiques d'activité in vitro, peuvent agir sur l'action du FVIII avec les autres constituants de la cascade de coagulation en se fixant sur des sites de la molécule fort distants des sites actifs. Ceux-ci, ainsi modifiés, peuvent interférer avec le repliement naturel du FVIII, altérant certaines de ses propriétés ("modèle allostérique").

Ces expériences de "mapping" utilisent des peptides synthétisés par des fragments de gènes du FVIII clonés dans *E coli*, et ne permettant qu'une idée approximative de la localisation des déterminants antigéniques reconnus par ces monoclonaux. En effet, la taille des fragments identifiés s'échelonne entre 30 et 100 acides aminés.

Actuellement, pour identifier sans équivoque les sites antigéniques d'une protéine, il faut la cristalliser et l'analyser aux RX. Malheureusement, on ne dispose d'aucune donnée pour le FVIII dont le haut poids moléculaire est un handicap majeur pour la cristallisation.

Les régions antigéniques coïncident avec le caractère hydrophile de ces régions : plus la séquence oligopeptidique sera exposée au milieu extérieur (située à la surface), plus cette partie sera susceptible d'être reconnue dans une réaction d'immunisation. Par contre, les parties hydrophobes, situées généralement à l'intérieur de la protéine, sont considérées comme peu antigénique.

Actuellement, une notion qui prédomine chez les patients hémophiles, les cliniciens et les fractionneurs, est la disponibilité d'un FVIII purifié, dépourvu de tout contaminant plasmatique pathogène et d'effets secondaires.

Cependant, que ce soit après immunopurification à l'aide de monoclonaux murins, ou après obtention par recombinaison génétique dans des cellules de mammifères, le FVIII hautement purifié est extrêmement instable pour des raisons qui ne sont pas apparentes. Pour pouvoir le stabiliser, on ajoute des quantités importantes d'albumine humaine plasmatique au cours de la purification de sorte que l'activité

spécifique finale est de l'ordre de 2-3 U/mg protéine. Il en va de même pour le rFVIII coexprimé avec du facteur von Willebrand, stabilisateur naturel, dans des cellules CHO. Ces données semblent suggérer une influence des étapes de purification sur la molécule de FVIII, pouvant interférer avec son repliement naturel, introduire des changements conformationnels plus ou moins stables et dévoiler des épitopes potentiels nouveaux après infusion chez le patient.

Une des complications sérieuses présente chez 5 à 50% selon les auteurs (Ljung et al. (1992); Sultan et al., (1992); Lorenzo et al. (1992)) des hémophiles qui reçoivent des infusions thérapeutiques multiples de FVIII, est l'apparition d'anticorps (inhibiteurs) qui inactivent le FVIII et rend inefficace toute injection ultérieure de FVIII.

L'apparition spontanée d'auto-anticorps avec une activité anti-FVIII pathologique est rare chez les non-hémophiles (prévalence: 10^{-5}) et est signalée chez les individus âgés, manifestant des troubles immunologiques ou en post-partum (Kessler (1991), Hultin (1991)). Une étude multicentrique effectuée sur 3435 patients hémophiles, montre que tous les groupes d'âge sont concernés y compris les patients de moins de 5 ans. La majorité (82%) présentent une réponse très élevée (>10 BU) (Sultan et al. (1992)). Ces anti-FVIII seraient composés essentiellement de IgG, de type IgG4 mais, des IgG2 (Gilles et al. (1993)b) IgA et des IgM ont été aussi décrits (Lottenburg et al. (1987)). Ils réagissent faiblement avec des molécules FVIII hétérologues purifiées d'autres mammifères (Bennett, B et al. (1972)). A l'heure actuelle, on ignore les causes qui induisent chez certains hémophiles l'apparition des inhibiteurs. S'il existe une association entre la sévérité de la délétion du gène et le développement d'une réponse immunitaire ne reconnaissant plus le FVIII comme une protéine du soi, cette association n'est démontrée que chez une minorité de patients. Aucune susceptibilité spécifique de l'hôte, liée à des marqueurs génétiques, n'a pu être mise en évidence comme par exemple une

association privilégiée avec certains déterminants du complexe MHC de classe II (Hoyer (1991)), sans doute, parce que tous les épitopes du FVIII, reconnus par les anticorps spécifiques n'ont pas encore été déterminés. Il semble aussi que les différentes
5 méthodes de préparation du FVIII pourraient influencer sa structure, ses propriétés physico-chimiques ou son micro-environnement naturel (Vermeyleylen, J and Peerlinck (1991); Gomperts, et al. (1992); Peerlinck et al. (1993)). Barrowcliffe et al. (1983) ont montré que les phospholipides protégeraient
10 l'activité procoagulante de l'inactivation par des anticorps spécifiques humains. La présence d'anticorps naturels anti-FVIII chez 17% de donneurs sains (screening effectué sur 500 dons de plasma), sans manifestation pathologique, démontre l'importance de mieux connaître l'aspect structural
15 tridimensionnel que revêt un FVIII physiologique (Ciavarella and Schiavoni (1992)).

La transfusion étudiée sur des cultures mixtes de lymphocytes, chez des modèles animaux et lors d'essais cliniques, a montré une modification de l'immunomodulation chez
20 le transfusé, induisant une allo-immunisation et aussi une down-regulation de certaines fonctions immunitaires. Elle se manifeste sous forme de cellules suppressives, d'anticorps anti-idiotypes ou une diminution des cellules NK. Tout se passe comme si on induisait un certain degré de tolérance. Ces effets
25 peuvent être renversés par l'infusion de l'interleukine-2 (IL-2) (Triulzi et al., 1990). In vitro, un effet inhibiteur de la sécrétion de IL-2 ainsi que la prolifération de mononucléaires de sang périphérique, sont obtenus en présence de cryoprécipité ou des préparations peu purifiées de FVIII
30 (0,5 à 10 U/mg protéines) (Madhok et al., 1991; Wadhwa, M et al., 1992). Ces effets ne sont pas observés en présence de rFVIII ou de FVIII purifiés par immunoaffinité. Cette dernière préparation aurait un effet activateur sur les cellules T (Madhok et al., 1991). Toutefois, ces données ne sont pas
35 directement extrapolables à une situation in vivo.

Il n'existe aucun modèle expérimental permettant de

poser un pronostic quant à l'immunogénéicité ou l'effet immunomodulateur des préparations de FVIII ou la susceptibilité de l'hôte avant leur administration clinique. Ce modèle devient une nécessité absolue devant l'augmentation de la fréquence d'apparition d'anticorps anti-FVIII lors des essais cliniques actuels utilisant des préparations de FVIII de très haute activité spécifique obtenues soit par immunopurification soit par des techniques d'ingénierie du DNA (Seremetis et al. (1991)). De plus, Aledorf (1993) montre qu'en utilisant ces deux types de préparations chez des sujets vierges, non transfusés auparavant (PUPS), on observe une prévalence en inhibiteurs allant jusqu'à 27%.

Etat de la technique.

Les patients qui développent une réponse immune anti-FVIII se trouvent dans une situation grave qui nécessite l'utilisation de moyens lourds, agressifs et excessivement coûteux. Une des techniques les plus utilisées est de noyer l'organisme en injectant régulièrement de très hautes doses de FVIII (100 à 200 U/kg/jour) (Ewing et al. (1988)) en association avec un complexe Prothrombine concentré (FEIBA) (protocole de Bonn), ce qui réduit effectivement le taux d'inhibiteurs dans le sang (Sultan et al., 1986). De plus, ce type de traitement doit être poursuivi pendant un temps très long (Lian et al., 1989). Les essais menés en utilisant des doses moindres de FVIII ont rencontré un certain succès chez des patients dont le taux d'anticorps anti-FVIII est beaucoup plus faible (Gruppo, (1991)).

Une voie alternative est l'utilisation de FVIII d'espèce non humaine comme celle de porc, non neutralisé par les anti-FVIII du patient et permettant l'hémostase. Une étude multicentrique a montré les bénéfices d'un tel traitement mais a aussi mis en évidence des anticorps anti-FVIII porcin (Lozier (1993); Moreau et al. (1993); Hay and Bolton-Maggs (1991); Clyne et al. (1992)). Le facteur VIII activé, obtenu par DNA recombinant, a été aussi utilisé comme voie alternative de la coagulation chez des patients présentant des inhibiteurs

(Ingerslev et al. (1991)).

Récemment, une stratégie fructueuse (Nilsson et al. (1990)) pour réduire le taux d'inhibiteurs a consisté à soumettre les patients à une circulation extra-corporelle pour
5 permettre l'absorption en phase solide des IgG totales sur Protéine A tout en les traitant avec des agents cytostatiques comme la cyclophosphamide.

L'infusion d'immunoglobulines intraveineuses polyvalentes (IVIG) combinées ou non avec un traitement
10 immunosuppresseur s'est révélée relativement efficace, la raison de cette efficacité n'étant pas encore bien établie. Différentes hypothèses ont été avancées impliquant une inhibition feed-back de la synthèse des IgG, le stimulation de leur clearance, l'activation des T suppresseurs (Bloom (1992)).
15 Une explication intéressante est que ces immunoglobulines intraveineuses commerciales contiendraient des anticorps capables de réagir avec des anticorps anti-FVIII au niveau de leur partie variable (idiotypes) et les neutraliser. Cette activité anti-idiotype serait spécifique à chaque donneur et
20 pourrait être synergique dans un pool d'IgG (Dietrich et al. (1992)).

Malheureusement, aucune de ces approches ne s'est révélée satisfaisante en termes de sécurité, d'efficacité et de coût.

25 Buts de l'invention.

La présente invention vise à obtenir une séquence polypeptidique antigénique du facteur VIII, des fragments et des épitopes de celle-ci, destinés à améliorer le diagnostic et/ou la thérapie de désordres immunitaires, en particulier
30 ceux induits par les inhibiteurs du FVIII, les inhibiteurs de la liaison du FVIII au facteur de von Willebrand (vWf) et/ou aux phospholipides membranaires (PL).

Un autre but de l'invention vise à obtenir des inhibiteurs présentant une immunoaffinité avec cette séquence
35 polypeptidique antigénique, ses fragments et/ou ses épitopes, destinés également à améliorer le diagnostic et/ou la thérapie

de désordres immunitaires.

Un but complémentaire vise à obtenir des anti-inhibiteurs, en particulier des anticorps, dirigés contre lesdits inhibiteurs susmentionnés, destinés à améliorer le diagnostic et/ou la thérapie de désordres immunitaires.

Brève description des figures.

La figure 1 représente de manière schématique la séquence polypeptidique du facteur VIII.

La figure 2 représente le graphique d'hydrophilicité de la séquence A3 du facteur VIII renumérotée de 1 à 371 acides aminés (valeur de surface pour chaque acide aminé).

La figure 3 représente le graphique de flexibilité de cette séquence A3 du facteur VIII.

La figure 4 représente le graphique d'accessibilité de cette séquence A3 du facteur VIII.

La figure 5 représente le graphique général reprenant la somme des valeurs définies dans les graphiques 2 à 4.

La figure 6 représente la mise en évidence d'anticorps anti-facteur VIII dans les séra de souris par un test ELISA.

Éléments caractéristiques de l'invention.

La présente invention concerne la séquence polypeptidique antigénique du facteur VIII et/ou des fragments de celle-ci, tels que décrits par Verhar et al. (Nature, vol. 312, p 339 (1984)).

On entend par "séquence polypeptidique du facteur VIII" la séquence naturelle humaine ou animale, éventuellement glycosylée, obtenue par purification de pools de plasma, en particulier la fraction I de Cohn, par synthèse et/ou ingénierie génétique (c'est-à-dire également une séquence éventuellement délétée des portions n'intervenant pas dans le mécanisme de coagulation sanguine) du facteur VIII.

La présente invention concerne en particulier la séquence polypeptidique antigénique du facteur VIII dépourvue

des fragments Alanine 322 - Sérine 750, Leucine 1655 - Arginine 1689, Lysine 1694 - Proline 1782 et Acide Aspartique 2170 - Tyrosine 2332.

La présente invention concerne en particulier les
5 séquences polypeptidiques antigéniques A1, A2, A3, et C (C1 et C2) du facteur VIII.

Dans la suite du texte, les acides aminés seront
représentés par leur abréviation en trois lettres ou par le
symbole d'une lettre unique telle qu'identifiée dans le tableau
10 ci-dessous.

Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Méthionine	Met	M
15 Acide Aspartique	Asp	D	Phénylalanine	Phe	F
Cystéine	Cys	C	Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q	Sérine	Ser	S
Acide Glutamique	Glu	E	Thréonine	Thr	T
20 Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

Une première forme d'exécution de l'invention
concerne la séquence polypeptidique antigénique A3 du facteur
25 VIII, des fragments et/ou des épitopes de celle-ci. Ladite
séquence est comprise entre l'Acide Glutamique 1649 et
l'Asparagine 2019, de préférence comprise entre l'Arginine 1652
et l'Arginine 1917 ou entre l'Arginine 1803 et l'Arginine 1917,
de la séquence polypeptidique du facteur VIII telle que publiée
30 par Verhar et al. (Nature, vol. 312, p 339 (1984)) et Toole et
al. (Nature, vol. 312, pp. 342-347 (1984)).

Préférentiellement, les fragments de ladite séquence
sont compris entre l'Arginine 1652 et l'Arginine 1696, de
préférence entre l'Arginine 1652 et l'Arginine 1689, entre la
35 Thréonine 1739 et l'Acide Aspartique 1831 ou entre l'Acide

12

Glutamique 1885 et l'Arginine 1917.

L'invention concerne également les épitopes de séquence de ces fragments, notamment:

- 5 - l'épitope compris entre l'Arginine 1652 et la Tyrosine 1664 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:1:

Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr

1 5 10

- 10 - l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 1681 et l'Arginine 1696 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:2:

Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg

1 5 10 15

15

- l'épitope compris entre la Thréonine 1739 et la Tyrosine 1748 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:3:

Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr

20 1 5 10

- l'épitope compris entre l'Asparagine 1777 et la Phenylalanine 1785 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:4:

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe

25 1 5

- l'épitope compris entre l'Acide Glutamique 1794 et la Tyrosine 1815 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:5:

30 Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro

1 5 10 15

Asn Glu Thr Lys Thr Tyr

20

35

13

- l'épitope compris entre la Méthionine 1823 et l'Acide Aspartique 1831 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:6:

Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp

5 1 5

- l'épitope compris entre l'Acide Glutamique 1885 et la Phenylalanine 1891 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:7:

10 Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe

1 5

- l'épitope compris entre l'Acide Glutamique 1893 et l'Alanine 1901 défini par la séquence suivante :

15 SEQ ID NO:8:

Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala

1 5

- l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 1909 et l'Arginine 1917 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:9:

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg

1 5

25 Avantageusement, ladite séquence, ses fragments particuliers et ses épitopes présentent une caractéristique antigénique illustrée par les figures 2 à 5 annexées.

 Une autre forme d'exécution préférée de l'invention concerne la séquence polypeptidique antigénique A1 du facteur
30 VIII, des fragments et/ou des épitopes de celle-ci.

 Préférentiellement, les fragments de ladite séquence sont compris entre l'Alanine 108 et la Méthionine 355, de préférence entre l'Alanine 108 et la Glutamine 228.

 L'invention concerne également les épitopes de
35 séquence de ces fragments, notamment :

14

- l'épitope compris entre l'Alanine 108 et la Valine 128 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:10:

	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys
5	1				5					10					15	
	Glu	Asp	Asp	Lys	Val											
					20											

10 - l'épitope compris entre l'Acide Glutamique 181 et la Leucine 192 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:11:

	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	Gln	Thr	Leu
	1				5					10		

15 - l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 203 et la Glutamine 218 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:12:

	Asp	Glu	Gly	Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln
	1				5					10					15	

20 - l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 327 et la Méthionine 355 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:13:

	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu
	1				5					10					15	
25	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met			
					20					25						

Une autre forme d'exécution préférée de l'invention concerne la séquence polypeptidique antigénique A2 du facteur VIII, des fragments et/ou des épitopes de celle-ci.

30 Préférentiellement, les fragments de ladite séquence sont compris entre l'Acide Aspartique 403 et l'Acide Aspartique 725, de préférence entre l'Histidine 693 et l'Acide Aspartique 725.

L'invention concerne également les épitopes de la
35 séquence de ces fragments, notamment :

15

- l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 403 et la Lysine 425 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:14:

	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro	Gln	Arg
5	1				5					10					15	
	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys									
																20

10 - l'épitope compris entre la Valine 517 et l'Arginine 527 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:15:

	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg
	1				5					10	

15 - l'épitope compris entre l'Histidine 693 et la Glycine 701 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:16:

	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly
	1				5				

20

- l'épitope compris entre la Sérine 710 et l'Acide Aspartique 725 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:17:

	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Try	Gly	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp
25	1				5					10					15	

30 Une dernière forme d'exécution préférée de l'invention concerne la séquence polypeptidique antigénique C du facteur VIII, des fragments et/ou des épitopes de celle-ci. De préférence, les fragments de ladite séquence sont compris entre la Lysine 2085 et la Lysine 2249, de préférence entre la Lysine 2085 et la Glycine 2121.

L'invention concerne également les épitopes de la séquence de ces fragments, notamment :

35

- l'épitope compris entre le Lysine 2085 et la Phénylalanine 2093 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:18:

Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe

5 1 5

- l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 2108 et la Glycine 2121 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:19:

10 Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly

1 5 10

- l'épitope compris entre la Glycine 2242 et la Lysine 2249 défini par la séquence suivante :

15 SEQ ID NO:20:

Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys

1 5

L'invention concerne également les parties fortes
20 desdits épitopes ou desdits fragments, c'est-à-dire les portions de séquence desdits épitopes comprenant les acides aminés Tyrosine et Histidine, qui présentent de manière inattendue une affinité particulièrement élevée vis-à-vis des inhibiteurs du facteur VIII. De préférence, ces parties fortes
25 comprennent ledit acide aminé Tyrosine ou Histidine lié à au moins deux autres acides aminés identiques ou différents.

Ces séquences, ces fragments et ces épitopes, en particulier les parties fortes des épitopes ou des fragment, sont caractérisés de manière particulièrement avantageuse par
30 une hydrophilicité élevée telle que décrite par Parker, Guo et Hodges (Biochemistry 25, pp 5425-5432 (1986)), une importante flexibilité telle que décrite par Karplus et Schultz (Naturwissenschaften 72, p 212 (1985)) et une importante accessibilité telle que décrite par Janin (Nature 277, pp 491-
35 492 (1979)) (voir figures 2 à 5).

Ces fragments et ces épitopes sont en particulier exposés à la surface de la protéine du facteur VIII et

présentent une caractéristique antigénique marquée.

Avantageusement, ladite séquence polypeptidique, ses fragments, ses épitopes et/ou ces parties fortes desdits fragments ou desdits épitopes sont également indépendamment immunogènes (c'est-à-dire qu'ils sont immunogènes même sans être complexés à une protéine de grande taille telle que la BSA, l'hémocyanine,...), et présentent de préférence une immunoaffinité avec des inhibiteurs du facteur VIII, tels que des anticorps anti-facteur VIII et/ou présentent une immunoaffinité pour les récepteurs des lymphocytes T et/ou B.

Cette séquence, ces fragments, ces épitopes et/ou les parties fortes desdits fragments ou desdits épitopes provoquent une réaction immunitaire (synthèse d'anticorps) lorsqu'ils sont injectés à un lapin.

Ces caractéristiques sont particulièrement importantes pour les épitopes SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:5 qui comprennent des séquences relativement "longues" en acides aminés, respectivement de 16 et 22 acides aminés.

Ces séquences sont donc caractérisées par une importante immunogénécité vis-à-vis d'anticorps monoclonaux et polyclonaux.

Cependant, ces séquences sont suffisamment courtes pour être aisément obtenues par synthèse.

A titre d'exemple, les peptides Asp 1681 - Arg 1696 et Asp 327 - Met 355 ont été synthétisés pour mettre en évidence des anticorps anti-facteur VIII dans les séra de souris par un test ELISA.

Les peptides libres (non couplés à une protéine vectrice) ont été injectés à deux souris BALB/C selon le schéma suivant :

- jour 0 100 µg de peptide émulsionné dans de l'adjuvant de Freund incomplet sont injectés par voie intramusculaire.
- jours 7, 14, 21 et 28 :
immunisation avec 50 µg de peptide.

Un échantillon de sang est prélevé chaque jour avant l'injection. Des plaques de microtitration en polystyrène (NUNC) sont saturées avec une préparation de facteur plasmatique diluée à l'aide de 40 UI/ml. 50 µl de dilutions croissantes (1/60, 1/300 et 1/600 à des antiséras de souris sont ajoutés aux puits. Après incubation et lavage, la présence d'anticorps anti-facteur VIII est mise en évidence par l'addition de 50 µl d'une dilution 1/5000 d'un anticorps de lapin anti-IgG de souris marquée à la biotine. Après incubation et lavage, les puits sont incubés avec 50 µl d'avidine-peroxydase (1/2500) et lavés, et finalement, 100 µl d'OPD sont ajoutés aux puits. La densité optique est mesurée à 490 nm. Les résultats des ELISA sont repris dans la figure 6 annexée (EXA, EX2 et un échantillon BLC qui sert de blanc).

La présente invention concerne également les épitopes conformationnels comprenant au moins deux fragments différents de ladite séquence, au moins deux épitopes de séquence et/ou au moins deux parties fortes desdits épitopes ou desdits fragments différents selon l'invention et identifiés ci-dessus.

Les épitopes conformationnels sont composés de deux ou plusieurs portions différentes d'une séquence polypeptidique situées à proximité les unes des autres lors du repliement de la protéine dans sa structure tertiaire ou quaternaire.

Ces épitopes sont susceptibles d'être "reconnus" (c'est-à-dire de présenter une immunoaffinité), de préférence simultanément, avec des inhibiteurs du facteur VIII, notamment des lymphocytes B (via le locus majeur d'histocompatibilité (MHC I et/ou II)) et/ou des anticorps anti-facteur VIII (Scandella et al., Blood 76, p 437 (1990)).

De préférence, ladite séquence, lesdits fragments, lesdits épitopes et/ou les parties fortes desdits épitopes ou desdits fragments sont complexés avec une protéine porteuse ou un peptide porteur, tels que la BSA ou l'hémocyanine, de manière à former un complexe présentant une plus forte immunogénéicité.

Un autre aspect de la présente invention concerne un inhibiteur du facteur VIII présentant une immunoaffinité avec la séquence polypeptidique antigénique selon la présente invention, avec des fragments, des épitopes de celle-ci, des parties fortes desdits épitopes ou desdits fragments et/ou le complexe selon l'invention.

On entend par inhibiteur, toute molécule biologique ou cellule intervenant avec et/ou contre le facteur VIII, et susceptible de créer des désordres immunitaires.

En particulier, un tel inhibiteur peut être un anticorps (gammaglobuline) monoclonal ou polyclonal ou un fragment d'anticorps anti-facteur VIII (tel que la portion hypervariable Fab dudit anticorps), qui inactive ledit facteur VIII et/ou qui inhibe la liaison du facteur VIII au facteur de von Willebrand et/ou aux phospholipides membranaires.

Avantageusement, lesdits inhibiteurs sont synthétisés par un animal "chimérique" comportant un système immunitaire humain tel qu'une souris SCID-hu produisant des anticorps humains.

Les souris SCID (severe combined immunodeficient) sont des souris présentant une déficience en lymphocytes B et T fonctionnels due à un dysfonctionnement de la recombinaison des gènes responsables des récepteurs antigéniques. Le système immunitaire des souris SCID peut être reconstitué avec des cellules immunocompétentes d'origine humaine provenant d'organes fœtaux ou de sang périphérique (Mosler et al. (1988).

Une fois reconstituées, ces souris SCID-hu produisent des anticorps humains soit spontanément, soit après immunisation.

Il semble qu'il n'existe pas de réactivité croisée dramatique entre les facteurs VIII humain et murin (Kessler, 1991).

Les lymphocytes du sang périphérique sont prélevés chez plusieurs types de donneurs : volontaires non hémophiles, hémophiles dépourvus d'inhibiteurs détectables par les méthodes classiques, hémophiles présentant un taux important

d'inhibiteurs ainsi que des donneurs produisant des auto-anticorps.

Ce modèle est utilisé dans deux types de travaux. D'abord, la reconstitution de souris est obtenue avec des
5 cellules d'un seul donneur, et après vérification de la reproductibilité du système, on peut comparer l'antigénécité de plusieurs préparations du facteur VIII.

D'autre part, ce modèle permet d'obtenir et d'étudier une réponse anti-facteur VIII au niveau clonal.

10 L'étude de la réponse spécifique monoclonale des cellules B est très importante, car elle permet précisément d'identifier les épitopes séquentiels et conformationnels du facteur VIII. Les cellules B sont cultivées clonées en présence ou non d'anti-CD40, à partir de la rate des souris produisant
15 des anti-facteur VIII, ou bien transformées en présence du virus EBV. Les anticorps anti-CD40 reconnaissent un antigène membranaire et activent les cellules B en présence d'une ligne de fibroblastes (Banchereau et al. (1991)). Il est dès lors possible d'envisager l'utilisation de ces épitopes
20 immunodominants comme cible possible de l'immunothérapie.

La détermination de marqueurs MHC de classe I et de classe II portés par les clones de lymphocytes B permet d'analyser la réponse immunitaire des anti-facteur VIII au niveau génétique, et ainsi de suivre la reconnaissance par les
25 cellules T spécifiques. Ceci est également une excellente méthode pour voir s'il existe un facteur de risque associé à cette pathologie.

Les souris BALB/C choisies pour la préparation des mAbs anti-facteur VIII sont préalablement injectées à trois
30 reprises à 2 semaines d'intervalle avec une solution de facteur VIII recombinant (rFVIII). Ce type de préparation présente l'avantage de contenir un facteur VIII de haute pureté à une concentration élevée avec un minimum de protéines contaminantes. Quatre jours après la dernière injection, les
35 splénocytes sont fusionnés avec des cellules d'un myélome de souris (SP207) (van Snick et Coulie (1982)). La sélection des

hybridomes produisant des anticorps anti-facteur VIII s'effectue par la technique ELISA utilisant des plaques de polystyrène sur lesquelles du rFVIII a préalablement été insolubilisé. Les surnageants d'hybridomes contenant des anticorps anti-facteur VIII sont clonés par la technique de dilution limite, puis cultivés in vitro.

Les anticorps sont purifiés par chromatographie au départ de ces surnageants.

La quantification, la détermination de la chaîne légère (k ou l) et la sous-classe (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) des mAbs anti-facteur VIII s'effectuent par la technique ELISA.

La détermination des épitopes reconnus sur la molécule de facteur VIII se réalise par la technique d'immunotransfert avec des solutions de facteur VIII natives ou après clivage enzymatique à la thrombine.

La capacité des mAbs anti-facteur VIII produits à inhiber la fonction est évaluée, pour chacun de ceux-ci, par une méthode de coagulation (méthode Bethesda) (Kasper et al. (1975)) ainsi que par une méthode chromogénique basée sur la capacité qu'a le facteur X activé par l'association du facteur VIII et du facteur IX activé, de transformer un substrat incolore en un substrat coloré (Svendsen et al. (1984)).

Les lignées cellulaires productrices d'anticorps monoclonaux humains anti-facteur VIII sont dérivées à partir des lymphocytes B humains prélevés dans la cavité abdominale de souris SCID immunisées avec différents lots de facteur VIII après reconstitution du système immunitaire des animaux avec des lymphocytes humains. Les lymphocytes B sont mis en culture en présence de cellules fibroblastiques exprimant un récepteur pour la portion Fc des immunoglobulines sur laquelle est fixé un anticorps monoclonal anti-CD40. Ces cellules activées par la polymérisation du récepteur CD40 sont alors infectées et immortalisées par le virus Epstein-Barr (Kozbor, (1981)). Les lignées cellulaires produisant les anticorps recherchés peuvent alors être sous-clonées.

Un autre aspect de l'invention concerne un anti-inhibiteur caractérisé en ce qu'il est dirigé contre ledit inhibiteur du facteur VIII précédemment décrit.

On entend par anti-inhibiteur dirigé contre
5 l'inhibiteur du facteur VIII, toute molécule biologique et/ou cellule susceptible d'interférer avec ledit inhibiteur de manière à assurer son inactivation.

De préférence, un tel anti-inhibiteur est un anticorps (monoclonal ou polyclonal), ou un fragment
10 d'anticorps anti-idiotypique anti-facteur VIII.

Avantageusement, ces anti-inhibiteurs dirigés contre les inhibiteurs du facteur VIII sont synthétisés par un animal "chimérique" présentant un système immunitaire humain tel qu'une souris SCID-hu.

15 Seules les souris qui produisent moins de 10 µg/ml d'immunoglobulines résiduelles sont utilisées pour les expériences.

Le modèle est mis au point en utilisant des globules blancs périphériques provenant de volontaires immunisés contre
20 le tétanos.

La reconstitution est menée avec une seule injection i.p. de 15 à 20.106 mononucléaires d'origine humaine. Ces cellules sont obtenues après centrifugation en gradient Ficoll-Hypaque de sang périphérique (environ 200 ml). Douze à vingt
25 souris peuvent être reconstituées à partir d'un seul donneur. La production d'immunoglobulines humaines est mesurée en fonction du temps.

Les anticorps anti-idiotypiques anti-facteur VIII sont purifiés à partir d'un pool de plasma de départ, qui est
30 constitué à partir de dons volontaires d'au moins 7200 donneurs pour augmenter la probabilité de trouver des anticorps anti-idiotypiques, par immunoaffinité au moyen d'anticorps anti-facteur VIII humains fixés de manière covalente sur une colonne de Sepharose ou par une partie Fc sur une colonne de protéine
35 G. Après fractionnement, par la méthode de Cohn-Oncley, deux fractions Fr II et Fr III riches en IgG sont obtenues. Elles

serviront de préparation de départ pour la purification des anticorps anti-idiotypiques. Ces anticorps monoclonaux seront obtenus à partir de cellules B prélevées chez les patients hémophiles. Ces cellules ont au préalable proliféré dans les
5 souris SCID et ont été transformées en cultures cellulaires sécrétrices par le virus EBV. L'utilisation de ces anticorps monoclonaux humains permet d'éviter l'introduction de protéines non humaines dans les préparations thérapeutiques. Ces préparations sont évaluées pour leur efficacité de
10 neutralisation des inhibiteurs provenant du plus grand nombre de patients hémophiles possible, par des analyses immunochimiques approfondies. Plusieurs étapes d'inactivation virale physique (traitement par rayonnement UVCF), thermique et/ou chimique (par exemple par solvant-détergent) sont
15 introduites dans le procédé de purification afin d'assurer la plus grande sécurité virale possible.

L'idiotype propre aux anticorps humains est analysé en séquençant la partie variable de la molécule. Ces données sont d'importance extrême, car elles sont de grande utilité ..
20 la fois dans le diagnostic et la régulation de la production des anti-facteur VIII.

Jusqu'à présent, la source d'anticorps nécessaires à la confection de complexes antigènes-anticorps a été autologue, c'est-à-dire que le patient lui-même fournissait les
25 anticorps. Nous savons depuis peu que des individus normaux avec des taux normaux de facteur VIII circulant, produisent des anticorps anti-facteur VIII dont l'activité dans le plasma est limitée par des anticorps anti-idiotypique correspondants. Des anticorps anti-facteur VIII préparés à partir d'un pool de
30 gammaglobulines peuvent remplacer avantageusement la source autologue.

Il est également possible d'obtenir des cellules B humaines transformées avec le virus EBV qui produisent des inhibiteurs de patients hémophiles ou non hémophiles. Quatre
35 lignées ont ainsi été obtenues, l'une d'elles reconnaissant la chaîne légère du facteur VIII. Des souris SCID ont été

repeuplées avec les cellules B sécrétrices d'inhibiteurs provenant de patients hémophiles ou non. La production est stimulée avec l'injection de facteur VIII plasmatique et de facteur VIII recombinant. Il est donc possible d'obtenir des
5 cultures continues in vitro produisant lesdits inhibiteurs. Cette technique permet également d'obtenir une production continue d'anticorps anti-idiotypes anti-facteur VIII.

Un autre aspect de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un élément choisi parmi
10 le groupe constitué par ladite séquence polypeptidique antigénique du facteur VIII, des fragments, des épitopes de celle-ci et/ou des parties fortes desdits épitopes ou desdits fragments, un inhibiteur du facteur VIII dirigé contre eux, un anti-inhibiteur dirigé contre ledit inhibiteur, et/ou un
15 mélange d'entre eux.

Un autre aspect de l'invention concerne un dispositif de diagnostic et/ou de purification, tel qu'un kit de diagnostic ou une colonne de chromatographie (telle que décrite par Ezzedine et al. (1993)), comprenant un élément choisi parmi
20 le groupe constitué par la séquence polypeptidique antigénique selon l'invention, des fragments, des épitopes de celle-ci et/ou les parties fortes desdits épitopes ou desdits fragments, le complexe selon l'invention, un inhibiteur dirigé contre eux, un anti-inhibiteur dirigé contre ledit inhibiteur, et/ou un
25 mélange d'entre eux.

Le dispositif de purification peut donc consister en une colonne de chromatographie telle que décrite par Ezzedine et al. (1993), comprenant la séquence du facteur VIII, des fragments, des épitopes de celle-ci et/ou les parties fortes
30 desdits fragments ou épitopes fixés à la phase solide de la colonne de chromatographie.

On fait ensuite passer sur cette colonne de chromatographie un liquide physiologique (tel que le sérum) d'un patient comprenant des inhibiteurs du facteur VIII,
35 lesdits inhibiteurs (par exemple des anticorps) se fixant de manière spécifique sur ledit facteur VIII, lesdits fragments,

lesdits épitopes ou lesdites parties fortes.

Après élution, il est possible de recueillir lesdits inhibiteurs en les faisant réagir avec des anti-inhibiteurs (anticorps anti-idiotypiques anti-facteur VIII).

5 Il est possible aussi de caractériser les anticorps anti-idiotypiques anti-facteur VIII présents dans un sérum en faisant passer ces anti-inhibiteurs sur une colonne de chromatographie sur laquelle des inhibiteurs du facteur VIII ont été fixés à la phase solide.

10 Un dernier aspect de l'invention concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des désordres immunitaires, en particulier ceux induits par les inhibiteurs du facteur VIII,
15 les inhibiteurs de la liaison du facteur VIII de von Willebrand (vWF) et/ou les inhibiteurs de la liaison du facteur VIII aux phospholipides membranaires.

Références.

- Aledort, LM (1993), Sem Hematol 30, 7-9
- Bardelle, C, Furie, B, Furie, BC and Gilbert, GE (1993), J.Biol Chem 268, 8815-8824
- 5 - Barrowcliffe, TW (1993), Sem Thromb Hemost 19, 73-79
- Bennet, B, Ratnoff, OD (1972), Procédé Sol Exp Biol Med 143, 137-155
- Bihoreau, N (1992), M/S 8, 1043-1050
- Blomm, AL (1992), haemost 22, 268-275
- 10 - Blanchereau, J, de Paoli, P, Vallé, A, Garcia, E and Rousset, F (1991), Science 251, 70
- Cauldfield, MJ and Schaffer, D (1987), J. Immunol 138, 3680
- Ciavarella, N and Shiovoni, M (1992), Lancet 339, 1301
- Clyne, LP, Levy, A, Stein and McPhedran, P (1992), Thromb and Haemost 68, 475-476
- 15 - Dietrich, G, Algiman, M, Sultan, Y, Nydegger, UE, Kazatchkine, MD (1992), Blood 79, 2946-2951
- Ehrenforth, S, Kreuz, W, Scharrer, I, Linde, R, Funk, M, Gungor, T, Krackhardt, B and Kornhuber, B (1992), Lancet 339, 594-598
- 20 - Elder, B, Iakich, D and Gitschier, J (1993), Genomics 16, 374-379
- Ewing, NP, Sanders, NL, Dietrich, SL and Kasper, CK (1988), JAMA 259, 65-68
- 25 - Fay, PJ (1993), Thromb Haemost 70, 63-67
- Fulcher, CA, Roberts, IZ, Holland, Tous and Zimmerman, Tous (1985), J.Clin Invest 76, 1117-1124
- Foster, PA, Fulcher, CA, Houghten, RA and Zimmerman, TS (1985), Blood 75, 1999-2004
- 30 - Gilles, JG, Armout, J, Vermylen, J and Saint-Rémy, JM (1991), XIVth Int Congress Allerg and Clin Immunol October 13-18
- Gilles, JG and Saint-Rémy, JM (1993a), XIVth Congress Int Soc thromb Haemost July 49
- 35 - Gomperts, ED, de Biasi, R and De Vreker, R (1992), Transfusion Med Rev 1, 44-54

- Gruppo, R (1991), *Thromb Haemostas* 65, 1168
- Halter, R, Carnwath, J, Espanon, G, Herrman, D, Lemme, E, Niemenn, H and Paul, D (1993), *Thériogenology* 39, 137-149
- Hay, CRM and Bolton-Maggs (1991), *Transfusion Med Rev* V, 145-151
- 5
- Hedner, U and Tenborn (1985), *Thromb Haemostas* 54, 776-779
- Hultin, MB (1991), *Am J. Med* 91 (Suppl 5A), 23-27
- Hoyer, LW (1991), *Am J. Med* 91 (Suppl 5A), 405-409
- Ingerslev, J, Feldstedt, M and Sindet-Pedersen (1991),
10 *Lancet* 338, 831-832
- Kalafatis, M, Rand, MD, Jenny, RJ, Erlich, YH and Mann, KG (1993), *Blood* 81, 704-709
- Kaufman, Rj (1992), *Transfusion Med Rev* VI, 235-246
- Kasper, CK, Aledort, LM, Edson, JR, Fratantone, J, Green, D et al (1975), *Thrombos Diathes Haemorrh* 34, 869
- 15
- Kemball-Cook, G and Barrowcliffe, TW (1992), *Thromb Res* 67, 57-71
- Kessler, CM (1991), *Am J Med* 91 (Suppl 5A), 15-19
- Kosbor, D and Roder, JC (1981), 127-1275
- 20
- Leroy, BL, Lachapelle, JM, Jacquemin, MG and Saint-Rémy, JMR (1992), *Dermatology* 184:271
- Leyte et al. (1989), *Biochem J.* 263, 189-194
- Lian, ECY, Larcada, AF and Chiu, AZY (1989), *Ann Int Med* 110, 771-778
- 25
- Ljung, R, Petrini, P, Lindgren, AC, Tengborn, L and Nilsson, IM (1992), *Lancet* 339, 1550
- Lorenzo, JL, Garcia, R and Molina, R (1992), *Lancet* 339, 1551
- Lottenburg, R, Kentro, TB and Kitchins, CS (1987), 147,
30 1077-1081
- Lozier, JN, Santagostino, E, Kasper, Ck, Teitel, JM and Hay, CRM (1993), *Sem Hematol* 30, 10-21
- Madhok, R, Smith, J, Jenkind, A and Lowe, GDO (1991), *Br J Haematol* 79, 235-238

- Mc Cune, LM, Namikawe, R, Kaneshima, H, Schultz, LD, Lieberman, M and Weissman, IL (1988), Sciences 241, 1632-1639
- Moreau, PH, Staikowsky, F, Laneelle, D, Dellile, F,
5 Simonin, D, Schiffer, C and Laurian, Y (1993), Presse Méd 22, 472-479
- Mosler, DE, Gulizia, RJ, Baird, SB and Wilson, DB (1988), Nature 335, 256-259
- Nesheim, ME, Furmaniak-Kazmierczak, E, Henin, CH and Côté,
10 G (1993), Thromb and Haemost 70, 80-86
- Nilsson, JM, Berntop, E, Zettervall, O and Dahlbäck, B (1990), Blood 10, 378-383
- Peerlinck, K, Arnout, J, Tamise, A, Vanherle, P, Fondu, P and Vermylen, J (1991), Acta Clin Belg 46, 298-304
- 15 - Peerlinck, K, Arnout, J, Gilles, JG, Saint-Rémy, JM and Vermylen, J (1993a), Thromb Haemost 69, 2, 115-118
- Peerlinck, K, Rosendaal, FR and Vermylen, J (1993b), Blood 81, 3332-3335
- Scandella, D, de Graaf Mahoney, S, Mattingly, M, Roeder, D, Timmons, L and Fulcher, CA (1985), Proc.Natl.Acad.Sci.
20 USA 85, 6152-6156
- Scandella, D, Timmons, L, Mattingly, M, Trabold, N and Hoyer, LW (1992), Thromb Haemost 65, 1160
- Seremitis, S, Aledort, L, Lusher, M, Hilgartner, M,
25 Mannucci, PM and Mariani, G (1991), Thromb Haemostas 65, 1160
- Smith, CIE, Habedi, M, Islam, KB, Johansson, MEB, Christenson, B and Hammerström, L (1991), Immunol Rev 124, 113-135
- 30 - Sultan, Y, Rossi, F and Kazatchkine, M (1987), Proc. Natl. Acad.Sci.84, 828-831
- Sultan, Y, White, GC, Aronstam, A, Bosser, C, Brackmann, HH et al (1986), Nouv Rev Fr Hematol 28, 85-89
- Sultan, Y and French Hemophilia Study Group (1992), Thromb
35 Haemost 67, 600-602

- Svendsen, L, Brogli, M, Lindeberg, G and Stocker, K (1984),
Thrombos Res 34, 457
- Triulzi, DJ, Heal, JM and Blumberg, N (1990), In
"Transfusion Medecine in the 1990's", Ed. Nance, ST;
5 American Association of Blood Banks; Arlington, Virginia
- Van Snick, J and Coulie, P (1982), J.Exp Med 155, 219
- Vermylen, J and Peerlinck, K (1991), Acta Clin Belg 46,
419-420
- Wadhwa, M, Dilger, P, Tubbs, J, Barrowcliffe, T, Mahon, B
10 and Thorpe, R (1992), Br J Haematol 82, 578-583
- Ware, J, MacDonald, MJ, Lo, M, de Graaf, S and Fulcher, CA
(1992), Blood Coagul Fibrin 3, 703-716
- Webb, E, Tkalcevic, S, Hocking, D and Nisbet, I (1993),
Biochem Biophys Res Commun 190, 536-543

REVENUDICATIONS.

1. Séquence polypeptidique antigénique, caractérisée en ce qu'elle est la séquence polypeptidique du facteur VIII.

2. Séquence polypeptidique antigénique, caractérisée
5 en ce que en ce qu'elle est dépourvue des fragments suivants :
Alanine 322 - Sérine 750, Leucine 1655 - Arginine 1689, Lysine
1694 - Proline 1782 et Acide Aspartique 2170 - Tyrosine 2332.

3. Séquence selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est immunogénique.

10 4. Séquence selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle présente une immunoaffinité avec des inhibiteurs du facteur VIII, de préférence avec des anticorps anti-facteur VIII.

5. Séquence selon la revendication 3 ou 4
15 caractérisée en ce qu'elle présente une immunoaffinité pour les récepteurs des lymphocytes T et/ou B.

6. Fragment antigénique de la séquence selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le groupe constitué par les séquences polypeptidiques A1, A2, A3 ou C du facteur VIII.

7. Fragment antigénique de la séquence polypeptique A3 selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le groupe constitué par le fragment de séquence compris entre l'Arginine 1652 et l'Arginine 1696, le fragment de séquence compris entre la Thréonine 1739 et l'Acide Aspartique 1831 et/ou le fragment de séquence compris entre l'Acide Glutamique 1885 et l'Arginine 1917.

8. Epitope de séquence du fragment selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le

30 groupe constitué par :

- l'épitope compris entre l'Arginine 1652 et la Tyrosine 1664 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:1:

Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr

35 1 5 10

- l'épitope compris entre l'Acide Glutamique 1893 et l'Alanine 1901 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:8:

Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala

5 1 5

- l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 1909 et l'Arginine 1917 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:9:

10 Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Try Arg

1 5

9. Fragment antigénique de la séquence polypeptidique A1 selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est choisi entre l'Alanine 108 et la Méthionine 355, de préférence entre

15 l'Alanine 108 et la Glutamine 228.

10. Epitope de séquence du fragment selon la revendication 9, caractérisé en qu'il est choisi parmi le groupe constitué par

- l'épitope compris entre l'Alanine 108 et la Valine 128 défini par la séquence suivante :

SEW ID NO:10:

Ala Ser Glu Gly Ala Glu Try Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys

1 5 10 15

Glu Asp Asp Lys Val

25 20

- l'épitope compris entre l'Acide Glutamique 181 et la Leucine 192 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:11:

30 Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu

1 5 10

- l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 203 et la Glutamine 218 défini par la séquence suivante :

35 SEQ ID NO:12:

Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln

1 5 10 15

- l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 327 et la Méthionine 355 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:13:

	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu
5	1				5					10					15	
	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met			
				20						25						

11. Fragment antigénique de la séquence polypeptidique antigénique A2 selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est compris entre l'Acide Aspartique 403 et l'Acide Aspartique 725, de préférence entre l'Histidine 693 et l'Acide Aspartique 725.

12. Epitope de séquence du fragment selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le groupe constitué par :

- l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 403 et la Lysine 425 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:14:

	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro	Gln	Arg
20	1				5					10				15		
	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys									
							20									

- l'épitope compris entre la Valine 517 et l'Arginine 527 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:15:

	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg
	1				5					10	

- l'épitope compris entre l'Histidine 693 et la Glycine 701 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:16:

	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly
	1				5				

- l'épitope compris entre la Sérine 710 et l'Acide Aspartique 725 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:17:

Ser Cys Aso Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Try Gly Asp Ser Tyr Glu Asp
 1 5 10 15

13. Fragment antigénique de la séquence
 5 polypeptidique antigénique C selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est compris entre la Lysine 2085 et la Lysine 2249, de préférence entre la Lysine 2085 et la Glycine 2121.

14. Epitope de séquence du fragment selon la
 10 revendication 13, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le groupe constitué par :

- l'épitope compris entre la Lysine 2085 et la Phénylalanine 2093 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:18:

15 Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
 1 5

- l'épitope compris entre l'Acide Aspartique 2108 et la Glycine 2121 défini par la séquence suivante :

20 SEQ ID NO:19:

Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly
 1 5 10

- l'épitope compris entre la Glycine 2242 et la
 25 Lysine 2249 défini par la séquence suivante :

SEQ ID NO:20:

Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
 1 5

15. Partie forte des fragments et/ou des épitopes
 30 selon l'une quelconque des revendications précédentes 6 à 14, caractérisée en ce qu'elle comprend l'acide aminé Tyrosine et/ou l'acide aminé Histidine lié à au moins deux autres acides aminés identiques ou différents.

16. Epitope conformationnel caractérisé en ce qu'il
 35 comprend au moins deux fragments différents, au moins deux épitopes différents et/ou au moins deux parties fortes différentes selon l'une quelconque des revendications

précédentes 6 à 15.

17. Complexe comprenant une protéine porteuse ou un peptide porteur lié à un élément choisi parmi le groupe constitué par la séquence, le fragment, l'épitope et/ou la
5 partie forte d'un épitope ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications précédentes.

18. Inhibiteur du facteur VIII caractérisé en ce qu'il présente une immunoaffinité avec la séquence, le fragment, l'épitope, la partie forte d'un épitope ou d'un
10 fragment et/ou le complexe selon l'une quelconque des revendications précédentes.

19. Inhibiteur selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est un anticorps ou un fragment d'anticorps anti-facteur VIII.

15 20. Anti-inhibiteur caractérisé en ce qu'il est dirigé contre l'inhibiteur du facteur VIII selon la revendication 18 ou 19.

21. Anti-inhibiteur selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est un anticorps ou un fragment
20 d'anticorps anti-idiotypique anti-facteur VIII.

22. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un élément choisi parmi le groupe constitué par la séquence, le fragment, l'épitope, la partie forte, le complexe, l'inhibiteur et/ou l'anti-inhibiteur selon
25 l'une quelconque des revendications précédentes.

23. Dispositif de diagnostic et/ou de purification caractérisé en ce qu'il comprend au moins un élément choisi parmi le groupe constitué par la séquence, le fragment, l'épitope, la partie forte, le complexe, l'inhibiteur et/ou
30 l'anti-inhibiteur selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 21.

24. Dispositif selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il est une trousse de diagnostic.

25. Dispositif selon la revendication 23, caractérisé
35 en ce qu'il est une colonne de chromatographie.

26. Utilisation de la composition pharmaceutique

selon la revendication 22 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou à la thérapie de désordres immunitaires.

27. Utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que les désordres immunitaires sont des désordres induits par les inhibiteurs du facteur VIII, les inhibiteurs de la liaison du facteur VIII au facteur de von Willebrand et/ou les inhibiteurs de la liaison du facteur VIII aux phospholipides membranaires.

28. Procédé de traitement thérapeutique et/ou préventif de désordres immunitaires, caractérisé en ce que l'on administre à un patient la composition pharmaceutique selon la revendication 22.

29. Procédé de traitement thérapeutique et/ou préventif selon la revendication 28, caractérisé en ce que les désordres immunitaires sont des désordres induits par les inhibiteurs du facteur VIII, les inhibiteurs de la liaison du facteur VIII au facteur de von Willebrand et/ou les inhibiteurs de la liaison du facteur VIII aux phospholipides membranaires.

30. Procédé d'identification et d'obtention d'inhibiteurs et/ou d'anti-inhibiteurs selon l'une quelconque des revendications précédentes 18 à 21, caractérisé en ce que l'on fixe sur un support solide d'une colonne de chromatographie un élément choisi parmi le groupe constitué par la séquence, le fragment, l'épitope, la partie forte et/ou le complexe selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 17, en ce que l'on fait passer sur ladite colonne de chromatographie un liquide physiologique, d'un patient comprenant des inhibiteurs du facteur VIII, en ce que l'on élue et on recueille la fraction des inhibiteurs du facteur VIII ayant présenté une immunoaffinité avec au moins un élément choisi parmi le groupe constitué par la séquence, le fragment, l'épitope, la partie forte et/ou le complexe selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 17, et éventuellement en ce ledit procédé comporte les étapes suivantes : on fixe lesdits inhibiteurs du facteur VIII

recueillis sur le support solide d'une colonne de chromatographie, on fait passer sur ladite colonne, des anti-inhibiteurs du facteur VIII, tels que des anticorps anti-idiotypiques anti-Facteur VIII, on élue et on recueille les
5 anti-inhibiteurs ayant présenté une immunoaffinité avec les inhibiteurs du facteur VIII.

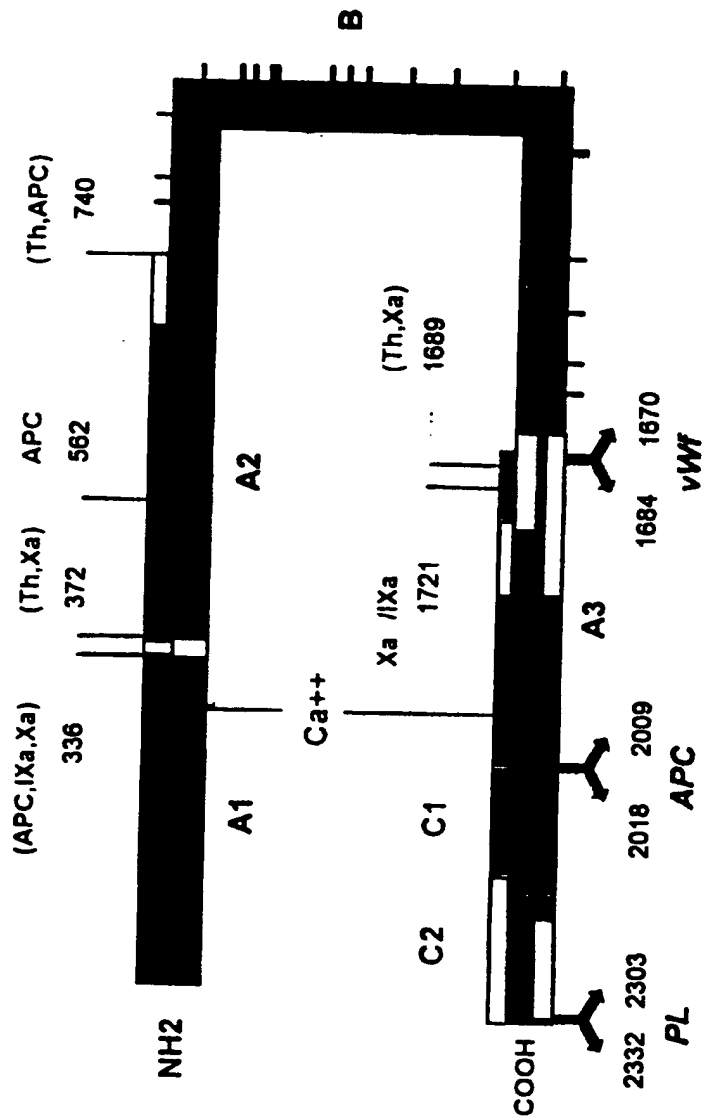
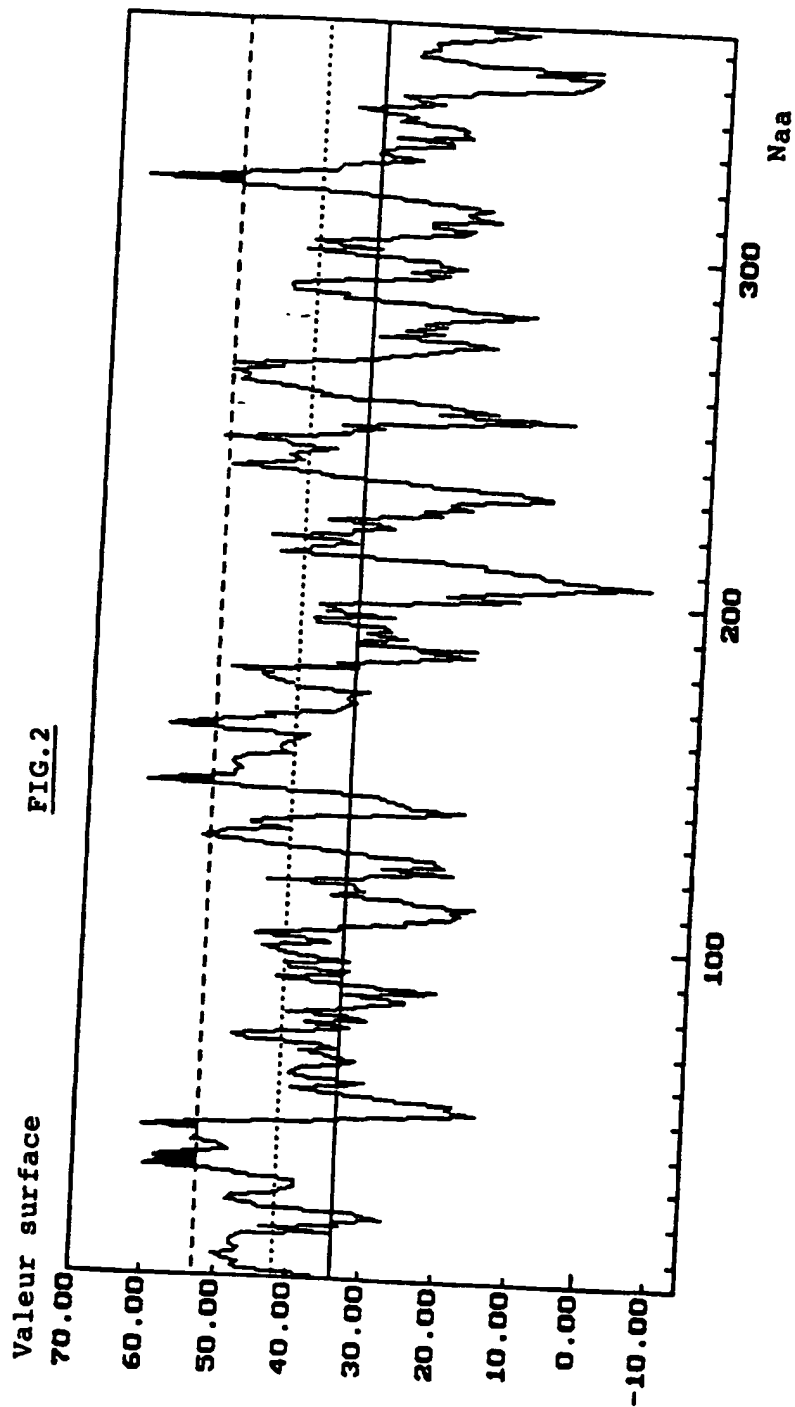


FIG.1



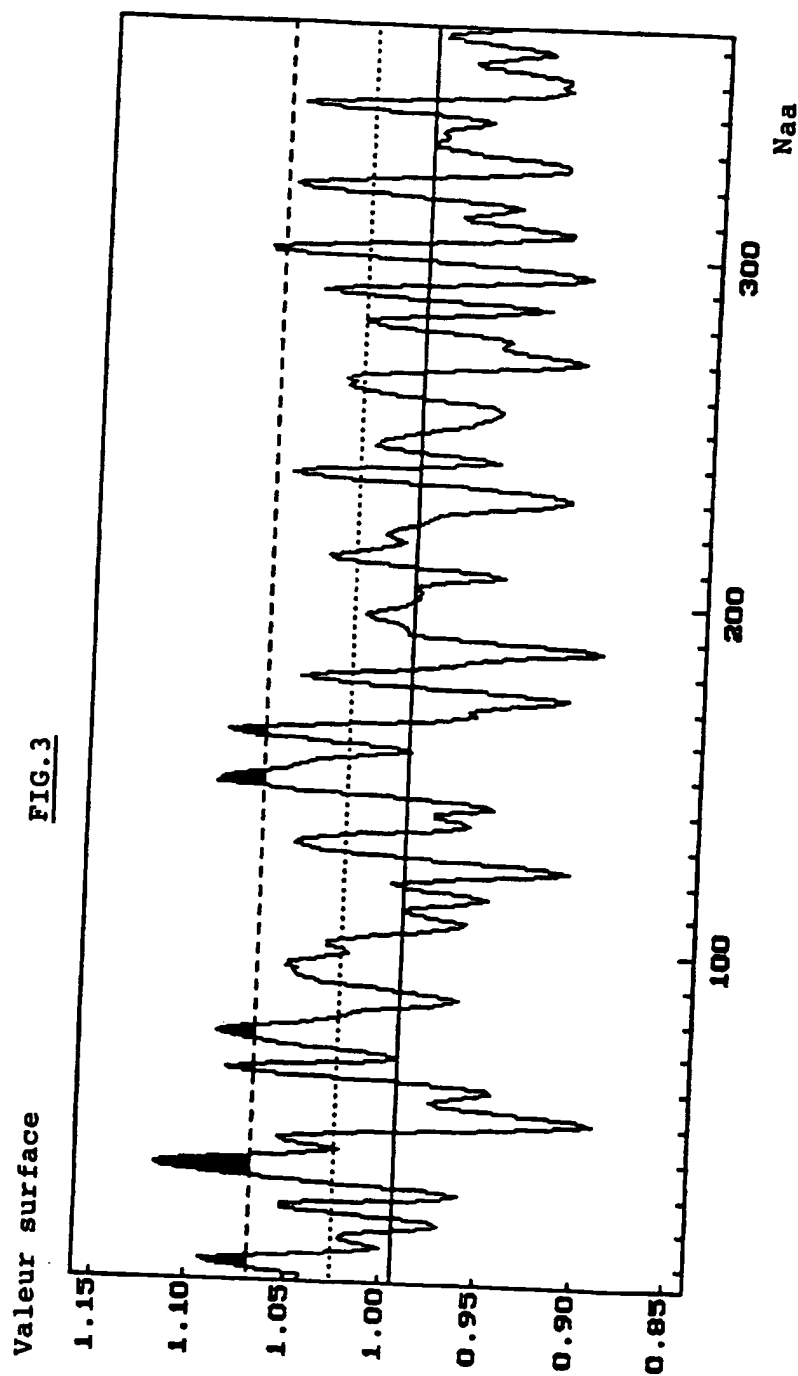


FIG. 4

